Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Fachrichtung Mikrobiologie

Die Immunadhärenz-Reaktion (IAR) zum Nachweis von Antikörpern gegen das Rhinovirus equi 1 in Pferdeseren und Versuche zur immunologischen Einordnung dieser Reaktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sigbort Dobbertin
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1973

Journal-Nr. 814

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0120

Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Fachrichtung Mikrobiologie

Die Immunadhärenz-Reaktion (IAR) zum Nachweis von Antikörpern gegen das Rhinovirus equi 1 in Pferdeseren und Versuche zur immunologischen Einordnung dieser Reaktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sigbort Dobbertin

Tierarzt aus Berlin

Berlin 1973

Journal-Nr. 814

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender:	Prof. Dr. H.-J. Sinell
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:	Prof. Dr. G. Monreal

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 11.7.1973

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	5
2. LITERATUR	7
2.1. Geschichtliches	7
2.2. Die IAR als serologische Reaktion	7
2.3. Reaktionsablauf der IAR	8
2.4. Abgrenzung der spezifischen Immunadhärenz	9
2.5. Die Immunglobuline des Pferdes	12
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
3.1. Material und Methoden	14
3.1. 1. Herstellung des Virusantigens	14
3.1. 2. Herkunft der Seren	15
3.1. 3. Behandlung der Seren	15
3.1. 4. Komplement	17
3.1. 5. Veronalpuffer	17
3.1. 6. Indikator-Erythrozyten	17
3.1. 7. Die Immunadhärenz-Reaktion (IAR)	18
3.1. 8. Die Komplementbindungsreaktion (KBR)	20
3.1. 9. Der Neutralisationstest (NT)	20
3.1.10. Die Auftrennung der Seren	21
3.2. Ergebnisse	23
3.2.1. Die IAR als serologische Reaktion	23
3.2.2. Weitere Absicherung der Spezifität	30
3.2.3. Versuche zur Beseitigung der Unspezifität	33
3.2.4. Die Auftrennung der Seren	34
3.2.5. Zusammenfassende Darstellung der Fraktionierungsversuche von Pferdeseren	39
4. DISKUSSION	41
5. ZUSAMMENFASSUNG	46
6. SUMMARY	47
7. LITERATURVERZEICHNIS	48

1. EINLEITUNG

Der Nachweis von Antikörpern gegen das Rhinovirus equi 1 in Pferdeseren gelingt mittels des Neutralisationstests (NT) und der Komplementbindungsreaktion (KBR). Während der NT durch die Verwendung von Zellkulturen zeitraubend ist, ist die KBR wesentlich schneller und einfacher durchzuführen (1, 29). Letztere hat aber den Nachteil, daß sie gegenüber dem NT wesentlich niedrigere Antikörpertiter erzielt. Aus diesem Grunde ist es wünschenswert, eine andere serologische Reaktion zu finden, die einerseits höhere Titerwerte als die KBR erbringt, andererseits aber bei der Durchführung der Antikörpertiter-Bestimmung auf Zellkulturen verzichten kann.

Als mögliche Alternative bietet sich die Immunadhärenz-Reaktion (IAR) an. Diese Reaktion wurde von PETERKNECHT (20) und PETERKNECHT und FALKE (21) für den serologischen Nachweis von Herpesvirus simplex und Antikörpern im Blutserum des Menschen ausgearbeitet. Sie ist auch für den Antikörpernachweis im Pferdeserum bei Rhinopneumonitis geeignet.

Der Vorteil dieser Reaktion liegt bei den sehr hohen Titern, die im Vergleich zu KBR und NT erzielt werden (3, 20, 21). Allerdings ist bei Untersuchungen von Pferdeseren mit dem Herpesvirus equi 1 aufgefallen, daß sich die Titer der IAR bei Verlaufsuntersuchungen anders als die KBR-Titer verhielten (TEUFEL, 30). Diese Tatsache legte die Vermutung nahe, daß für die IAR andere Immunglobuline als bei der KBR von Bedeutung sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit stellte sich die Aufgabe in zwei Richtungen: Zunächst sollte die Eignung der IAR zum Nachweis von Antikörpern gegen das Rhinovirus equi 1 geprüft werden. Dabei sollten die Ergebnisse der IAR mit

Ergebnissen der KBR und des NT verglichen werden. Weiterhin war durch Auswertung von fraktionierten und auf andere Art behandelten Einzelseren möglichst klarzustellen, wie die TAR insbesondere gegenüber der KBR immunologisch einzuordnen ist.

2. LITERATUR

2.1. Geschichtliches

Der Begriff für die Immunadhärenz wurde von R.A. NELSON (zitiert nach 19) geprägt. Man stellte sich dabei ein Anheften von Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexen an unbehandelten menschlichen Erythrozyten vor, die der Blutgruppe O angehörten, oder an Nicht-Primaten-Thrombozyten oder anderen Indikator-Partikeln.

Ein geschichtlicher Abriß über die Erforschung der IAR ist in der Übersichtsarbeit "Immune Adherence" von D.S. NELSON (19) dargelegt. Nach NELSON wurde die Immunadhärenz zum ersten Mal von LAVERAN und MESNIL sowie von LEVADITI 1901 beschrieben. Während LAVERAN und MESNIL das Anheften von Trypanosoma lewisi an Leukozyten immuner Ratten beobachteten, konnte LEVADITI zeigen, daß eine Adhärenz von Vibrio cholerae nur an Thrombozyten und Leukozyten immunisierter Kaninchen erfolgte. D.S. NELSON führt in seiner Arbeit weiter aus, daß DUKE und WALLACE 1930 als erste eine Erythrozyten-Adhäsions-Reaktion in Anwesenheit von Trypanosomen, spezifischen Antikörpern und Primaten-Erythrozyten beobachteten. Die Komplementabhängigkeit dieser Reaktion zeigten WALLACE und WORMALL.

2.2. Die IAR als serologische Reaktion

Eine erste systematische Anwendung der Immunadhärenz als serologische Reaktion führten R.A. und D.S. NELSON durch. Sie arbeiteten eine Methode zur Bestimmung von Antikörpertitern in menschlichen Seren bei Leptospirose und Syphilis aus. Dieselben Autoren erwähnten auch die mögliche Anwendung der IAR zum Nachweis von Antikörpern gegen Virusantigene. Aber ebenso wie FULTON (6) und TAVERNE (28) beschränk-

ten sie sich auf die Feststellung eines positiven Ergebnisses (36) der Reaktion, ohne auf eine detaillierte Versuchsanordnung einzugehen.

Eine serologische Methode zum Nachweis herpesspezifischer Antikörper in menschlichem Serum mit Hilfe der IAR wurde von PETERKNECHT und FALKE (21) erstellt. Sie entwickelten optimale Versuchsbedingungen und zeigten durch die Untersuchung von Einzelserumproben und fünf Serumpaaren von Personen mit klinisch gesicherter Herpes-Primärinfektion mittels KBR, NT und IAR, daß die IAR eine spezifische Nachweismethode für Herpes-Antikörper ermöglicht.

Aus einem Vergleich der Titerergebnisse von KBR, NT und IAR ging hervor, daß die IAR etwa zehnfach höhere Titer erbrachte als die KBR und in der Empfindlichkeit des Antikörpernachweises dem NT gleichzusetzen war.

Nach dem Prinzip der IAR erarbeiteten BITTER-SUERMANN und FALKE (2) die Methode der Immunadhärenz-Hämadsorption. Mit dieser Reaktion war es möglich, virus- oder zellspezifische Antigene auf oder in Membranen von lebenden Zellen in vitro nachzuweisen.

2.3. Reaktionsablauf der IAR

Die Vorgänge, die bei einer Immunadhärenz-Reaktion ablaufen, beschrieb D.S. NELSON (19) wie folgt:

1. Die Reaktion des Antigens mit seinem Antikörper
2. Die Reaktion des Antigen-Antikörper-Komplexes mit dem Komplement.

R.A. NELSON (19) wies 1956 nach, daß für das Zustandekommen der IAR die Komplementkomponenten C'1-4-2-3 mit dem Antigen-Antikörper-Komplex reagieren müssen. Er zeigte ferner, daß der Komplex Ag-Ak-C'1-4-2 hinsichtlich der IAR

inaktiv, der Komplex Ag-Ak-C'1-4-2-3 dagegen aktiv ist.

Der von R.A. und D.S. NELSON postulierte Reaktionsablauf läßt sich in folgendem Schema wiedergeben:

$$Ag + Ak = Ag\text{-}Ak$$

$$Ag\text{-}Ak + C'1 + C'4 + Ca^{++} = Ag\text{-}Ak\text{-}C'1\text{-}4$$

$$Ag\text{-}Ak\text{-}C'1\text{-}4 + C'2 + Mg^{++} = Ag\text{-}Ak\text{-}C'1\text{-}4\text{-}2$$

$$Ag\text{-}Ak\text{-}C'1\text{-}4\text{-}2 + C'3 = Ag\text{-}Ak\text{-}C'1\text{-}4\text{-}2\text{-}3$$

$$Ag\text{-}Ak\text{-}C'1\text{-}4\text{-}2\text{-}3 + E = IA$$

wobei Ag = Antigen, Ak = Antikörper, C'1-4-2-3 = Komplementfaktoren, E = menschliche Erythrozyten der Blutgruppe 0 und IA = Immunadhärenz bedeuten.

2.4. Abgrenzung der spezifischen Immunadhärenz

Im Verlauf der Entwicklung der IAR als serologische Reaktion sind einige andere Reaktionen bekannt geworden, die eine IAR vortäuschen können.

Die Tabelle 1 gibt Auskunft über die Charakteristika dieser Reaktionen und über die Möglichkeiten, die Reaktionen von der IAR abzugrenzen.

Die meisten Reaktionen lassen sich dadurch ausschließen, daß für ihren Ablauf nicht alle Komponenten der IAR benötigt werden. Anders verhält es sich bei der Konglutination und der "komplementabhängigen mixed aggregation". Die Konglutination ist auf Bovidenserum beschrankt und kann bei Verwendung von Seren und Komplement anderer Spezies vernachlässigt werden. Die komplementabhängige mixed aggregation wird durch den negativen Ausfall der Reaktion nach Adsorption mit Indikator-Erythrozyten ausgeschlossen.

Neben diesen Adhärenz-Reaktionen können Unspezifitäten im

Reaktion	notwendige Komponenten für positive Reaktion			vermutliche Komplexbildung	Bemerkungen
	Antig.	Antik.	Kompl.		
I A R	ja	ja	ja	Ag-Ak-C'1-4-2-3	
komplementabhängige mixed aggregation	ja	ja	ja	Ag_1-Ak_1-C'1-4-2-3 -Ag_2-Ak_2	nach Adsorption mit Indikator-Erythrozyten neg. Ausfall d. Reaktion
Konglutination	ja	ja	ja	Ag-Ak-C'1-4-2-3 -Konglutinin-Ak-Ag	auf Bovidenserum beschränkt, keine Reaktion bei Verwendg. von Meerschwein.-Komplement
mixed agglutination	ja	ja	nein	Ery-Ag-Ak-Leukozyt	
mixed antiglobulin reaction	ja	ja	nein	Ery-Ag-Ak-Ag-Leukozyt	
bakterielle Adhärenz	ja	ja	nein		tritt nur in Verbindung mit Plasmazellen auf
Hämagglutination	ja	nein	nein	Ag-Ery	Agglutination der Erythrozyten durch bakt. u. virale Hämagglutinine
Säureadhärenz	nein	nein	nein		bei p_H-Werten des Serums unter 4,0 spontane, unspez. Reaktion

Tab. 1: Die Abgrenzung der spezifischen Immunadhärenz

Verlauf der IAR auftreten. So beschrieben REGENDANZ und JURIKOFF (zitiert nach 19) eine unspezifische Adhärenz bei menschlichen Seren. Für diese Reaktion machte R.A. NELSON (zitiert nach 19) natürliche Antikörper verantwortlich, denn auch er hatte nachgewiesen, daß mit Hilfe der IAR im Serum nichtinfizierter und nichtimmunisierter Tiere Antikörper gegen Staphylokokken, S. typhosa, M. tuberculosis und Erysipelothrix rhusiopathiae nachzuweisen sind.

FJELLSTRÖM und HÖGMANN (zitiert nach 19) zeigten, daß derartige natürliche Antikörper zusammen mit menschlichem Komplement Kulturzellen fetaler menschlicher Lungen für die Adhärenz menschlicher Erythrozyten sensibilisieren können.

TURK (31, 32, 33) bezeichnete die natürlichen Antikörper als Ursache der "primär unspezifischen Immunadhärenz-Aktivität". Seine Untersuchungen ergaben, daß Polysaccharide wie Amylose und Dextran die unspezifische Aktivität absorbieren können. Deswegen interpretierte TURK die "unspezifische Immunadhärenz-Aktivität" als Reaktion mit Antigendeterminanten vieler Bakterien und Polysaccharide.

PETERKNECHT und FALKE (21) beobachteten bei der Durchführung der IAR, BITTER-SUERMANN und FALKE (2) bei der Immunadhärenz-Hämadsorption eine unspezifische Reaktion, die sie als "background" bezeichneten. Die Unspezifität trat in den Antigen-Komplement-Kontrollen und in den Komplement-Kontrollen auf.

CLAUSS und FALKE (4) untersuchten die Ursache des "backgrounds". Sie zeigten, daß die Komplementfaktoren C'1, C'4, C'2, C'3 sowohl für die spezifische als auch für die unspezifische Reaktion verantwortlich sind, und vermuteten, daß Mycoplasmen die Ursache des Phänomens sein könnten. Die Unspezifität der Immunadhärenz-Hämadsorption erklärten sie mit Rezeptoren für das Komplement, die denen der Antikörper gleichen und auf der Zelloberfläche vorhanden sein können.

2.5. Die Immunglobuline des Pferdes

Bei der Klassifizierung der Immunglobuline des Pferdes sind anfänglich Analogieschlüsse zu den menschlichen Immunglobulin-Klassen gezogen worden, wobei die Bezeichnungen der Immunglobulin-Klassen große Verwirrung hervorriefen (10, 24).

Die Immunglobuline des Pferdes sind grundsätzlich ähnlich wie bei anderen Tierarten aufgebaut (35). Eine 7S-Grundeinheit besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die kovalent durch Disulfidbrücken verbunden sind (8). Die neueste Nomenklatur der Immunglobuline des Pferdes (5, 18) ist zusammen mit den biologischen und serologischen Eigenschaften in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Bezeichnung der Immunglobulin-Klassen IgM, IgG (12, 17) und IgA erfolgt in Analogie zu den Immunglobulinen des Menschen.

Molekulargewicht und Sedimentationskonstante lassen erkennen, daß die Immunglobuline des Pferdes aus 7S-Untereinheiten und deren Polymeren aufgebaut sind. Die angegebenen Serumkonzentrationen stellen Durchschnittswerte dar, die nach Rasse, Alter und Haltung variieren können.

Die Komplementfixation bezieht sich auf die Fixation von Meerschweinchenkomplement (11). In bezug auf die Präzipitation des IgM bestehen unterschiedliche Aussagen (5, 18, 22). Über die Eigenschaft der Hämagglutinationshemmung besteht nur für das IgM und $IgG_{a,b}$ Klarheit. Ob auch das IgG(T) diese Eigenschaft besitzt, steht in Frage.

Die Eigenschaft des $IgG_{a,b}$, $IgG_{a,b}$ und IgG_1, eine passive kutane Anaphylaxie hervorzurufen, sagt nichts über die biologische Eigenschaft dieser Immunglobuline beim Pferd aus, sondern bedeutet, daß diese Immunglobuline eine Affinität zur Meerschweinchenhaut besitzen.

Typ	Mol.-gew.	Sed.-konst.	Komplement-fixation	passive kut. Anaphylaxie	Hämagglut.-hemmung	präzipi-tierend	Serumkonz. mg/ml
IgM	990.000	19,8 S	ja	ja	ja	nein?	1,0
$IgG_{a,b}$	152.000	7 S	ja	ja	ja	ja	13,0
IgG_c	152.000	7 S	nein	nein		ja	
IgG(T)	152.000	7 S	nein	nein	?	nein	8,0
IgG_1		9-15 S meist dimer 2x7 S	ja	ja			0,5
IgA_s	400.000	dimer 11,2 S					
IgA	150.000-700.000 bzw. 340.000	7 S oder 2x7 S oder 4x7 S	nein			nein	1,5

Tab. 2: Die Immunglobuline des Pferdes und ihre serologischen bzw. biologischen Eigenschaften (nach CRAWFORD et al. (5) und MONTGOMERY (18))

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In Vorversuchen wurde zunächst die prinzipielle Möglichkeit geprüft, mittels der IAR spezifische Antikörper gegen das Rhinovirus equi 1 nachzuweisen. Daraus resultierende Fragestellungen über die Brauchbarkeit der IAR als serologische Reaktion sollten in den Hauptversuchen durch die Untersuchung von 323 Seren geklärt werden. Versuche zur immunologischen Einordnung der IAR stellten schließlich den zweiten Teil der eigentlichen Hauptversuche dar.

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Herstellung des Virusantigens

Der equine Rhinovirusstamm NM_{11} wurde in dem permanenten Rhesusaffennieren-Zellstamm LLC-MK_2 gezüchtet. Die Vermehrung des Zellstammes erfolgte in Rouxflaschen, wobei die Zellen mit kalzium- und magnesiumfreiem Trypsin von der Glaswand abgelöst und im Verhältnis 1:3 im Anzuchtmedium aufgenommen wurden. Als Anzuchtmedium diente ein Hanks-Laktalbumin-Medium unter Zusatz von 10 % Kälberserum und 100 IE Penicillin G sowie 100 µg Streptomycinsulfat pro 1 ml Medium.

Die Kulturgefäße wurden 3 - 4 Tage bei 37° C stationär bebrütet. In diesem Zeitraum entwickelte sich ein dichter Zellrasen. Für die Virusvermehrung wurde das Anzuchtmedium durch das kälberserumfreie, synthetische Medium L-15 ersetzt und die Zellkulturen in den Rouxflaschen mit je 1 ml der 8. - 12. LLC-MK_2-Viruspassage beimpft.

Nach einer durchschnittlichen Bebrütungsdauer von 2 Tagen war der Zellrasen zu etwa 80 % virusspezifisch zerstört. Für die weitere Antigenaufbereitung wurden die Zellen mehrmals durch Einfrieren und Auftauen thermisch gebeugt. Die

so gewonnene virushaltige Zellkulturflüssigkeit wurde 30 min bei 5.000 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend gegen Veronalpuffer durch Unterdruckdialyse in einem Verhältnis von 30:1 eingeengt.

Herstellung des Normalantigens

Eine Rouxflasche mit dichtem LLC-MK_2-Zellrasen wurde mit 80 ml L-15-Medium beschickt. Die Zerstörung der Zellen erfolgte nach 2tägiger Bebrütung durch thermisches Beugen. Die groben Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand in der gleichen Weise wie das Virusantigen eingeengt.

3.1.2. Herkunft der Seren

Die untersuchten Pferdeseren erhielt das Institut freundlicherweise über Herrn Prof. Dr. KELLER (Klinik für Pferdekrankheiten der Freien Universität Berlin) aus verschiedenen Berliner Beständen. Insgesamt standen 323 Serumproben von 149 Pferden zur Verfügung. Ein Teil der Seren war bereits im Neutralisationstest und in der KBR am hiesigen Institut auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das Rhinovirus equi 1 Stamm NM_{11} getestet worden (29).

Für die Fraktionierung des Pferdeserums diente ausschließlich das Serum von zwei Pferden, die hohe neutralisierende und komplementbindende Antikörpertiter gegen das equine Rhinovirus aufwiesen.

3.1.3. Behandlung der Seren

3.1.3.1. Entfettung des Serums mit Chloroform

Die Serumprobe wurde mit einem gleichen Anteil Chloroform 20 min ausgeschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 min 2.000 U/min). Der Überstand wurde abgehebert und

das im Restserum verbliebene Chloroform durch Unterdruck entfernt.

3.1.3.2. Absorption des Serums mit menschlichen Erythrozyten der Blutgruppe O als Indikator-Erythrozyten

Die Absorption des Serums mit Indikator-Erythrozyten erfolgte durch das Mischen von einem Teil Serum und einem Teil einer 0,5 %igen Indikator-Erythrozytensuspension. Das Gemisch wurde entweder eine Stunde bei $+4^{\circ}$ C aufbewahrt oder eine Stunde lang bei 37° C inkubiert. Eine Zentrifugation (10 min 2.500 U/min) schloß sich an. Das überstehende Serum wurde in der IAR getestet.

3.1.3.3. Absorption des Komplements mit Indikator-Erythrozyten

Meerschweinchen-Komplement wurde mit einer 0,5 %igen Indikator-Erythrozytensuspension bei $+4^{\circ}$ C sowie bei 37° C für 30 min absorbiert. Die Erythrozyten wurden dann abzentrifugiert und das Komplement für die IAR verwendet.

3.1.3.4. Serumbehandlung mit Kaliumperjodat

Bei Zimmertemperatur wurden 0,064 g KJO_4 in 25 ml destilliertem Wasser gelöst und drei Teile dieser Kaliumperjodat-Lösung mit einem Teil Serum für 15 min zur Reaktion gebracht. Es folgte die Zugabe von drei Teilen 1 %igem Glycerol und einem Teil physiologischer Kochsalzlösung.

3.1.3.5. Serumbehandlung mit Kohlendioxyd

Die Serumprobe wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt und mit Kohlendioxyd begast. Nach etwa 10 min fiel ein weißer Niederschlag aus, der abzentrifugiert wurde. Eine 8,5 %ige Kochsalzlösung diente dazu,

die überstehende Serumverdünnung isotonisch zu machen.

3.1.3.6. Serumbehandlung mit Kaolin

Die Serumprobe wurde im Verhältnis 1:5 mit Boratsalzlösung p_H 9,0 verdünnt und nach Zugabe von 25 %iger Kaolinsuspension für 20 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach Zentrifugation (30 min 3.000 U/min) konnte der Überstand in der IAR getestet werden.

3.1.3.7. Serumbehandlung mit 2-Mercaptoäthanol

Die Serumprobe wurde mit dem gleichen Anteil 0,2 m 2-Mercaptoäthanol versetzt und für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Es folgte eine 24stündige Dialyse gegen Veronalpuffer.

3.1.4. Komplement

Als Komplement diente Meerschweinchenserum von instituts-eigenen, konventionell gehaltenen Tieren. Das Serum wurde unmittelbar nach Gewinnung bei -24° C maximal 8 Wochen in Ampullen in einer Menge von 1 ml aufbewahrt.

3.1.5. Veronalpuffer

Ein Veronalpuffer nach MAYER, OSLER, BIER und HEIDELBERGER (16), der 0,4 % Gelatine enthielt, wurde zur Verdünnung der Seren, des Komplements, des Antigens und zur Herstellung der Erythrozytensuspension verwendet.

3.1.6. Indikator-Erythrozyten

Als Indikator-Partikel dienten Human-Erythrozyten der Blutgruppe 0, die bei der Entnahme mit Alsever's-Lösung 1:1 vermischt und bei +4° C aufbewahrt wurden. Kurz vor dem Ge-

brauch wurden die Erythrozyten zweimal in physiologischer Kochsalzlösung und einmal in Veronalpuffer gewaschen. Das Sediment wurde zu einer 0,5 %igen Erythrozytensuspension in Veronalpuffer aufgeschwemmt.

3.1.7. Die Immunadhärenz-Reaktion (IAR)

Zur Durchführung der IAR wurde das Mikrotitersystem (24) der Firma Cooke Engineering, Alexandria/Va., USA, verwendet. Es wurden ausschließlich die Platten mit "U"-förmigen Vertiefungen benutzt. Der Ansatz der IAR erfolgte im wesentlichen nach der Methode von PETERKNECHT und FALKE (21).

3.1.7.1. Verwendung des Komplements

Im Gegensatz zur KBR, bei der die Komplementgebrauchsdosis sehr exakt ermittelt werden muß, wird in der IAR mit einem Komplementüberschuß gearbeitet. Auswertungen, die wie beim Hauptversuch, in Anwesenheit von Antigen, einem sicher positiven Serum und Komplement in Konzentrationen von 4 - 10 % durchgeführt wurden, zeigten keine unterschiedlichen Ergebnisse. Deshalb ist das Komplement in allen Untersuchungen, wie auch bei PETERKNECHT und FALKE (21) beschrieben, in einer 5 %igen Konzentration verwendet worden.

3.1.7.2. Antigen-Auswertung

Das eingeengte Virusantigen wurde im Schachbrettversuch bis 1:16 verdünnt und gegen ein positives Serum in steigenden Verdünnungen, wie im Hauptversuch, ausgetestet. Im Hauptversuch fand die Antigenverdünnung Verwendung, die noch den höchsten Titer erbrachte.

Die Gebrauchsverdünnung lag je nach Antigencharge zwischen 1:4 und 1:10.

3.1.7.3. Hauptversuch

In alle Vertiefungen der Titrierplatten wurde 0,025 ml Veronalpuffer vorgelegt, dann die Serumproben eingebracht und mit den Loops Verdünnungsreihen von 1:2 bis 1:256 hergestellt. Anschließend wurden Antigen und Komplement (je 0,025 ml) eingetropft. Es folgte eine Wärmeinkubation 30 min bei 37° C. Danach wurden jeweils zwei Tropfen (0,05 ml) einer 0,5 %igen Indikator-Erythrozytensuspension hinzugegeben. Nach 10 min Vorbebrütung bei 37° C wurden die Titrierplatten leicht geschüttelt, so daß es zur Aufwirbelung der Erythrozyten kam. Während der Nachbebrütung bei 37° C erfolgte die Sedimentation der Erythrozyten, so daß das Reaktionsergebnis nach etwa 30 min abgelesen werden konnte. Dabei galten folgende Bewertungsmaßstäbe:

4 + : Schleier mit gezackten Rändern
3 + : kontinuierlicher Schleier
2 + : Schleier mit partieller Knopfbildung
0 : Knopfbildung

Als positiv wurde die Serumverdünnung bewertet, die noch einen vollständigen Agglutinationsschleier (3 +) aufwies.

3.1.7.4. Kontrollen

Zur eindeutigen Bewertung des Hauptversuchs wurden folgende Kontrollen angesetzt:

Kontrolle 1: Serum (1:2 bis 1:256) plus Komplement plus Erythrozyten
Kontrolle 2: Komplement plus Erythrozyten
Kontrolle 3: Serum (1:2) plus Erythrozyten
Die vierte Kontrolle sollte prüfen, ob im Komplement für das Antigen homologe Antikörper enthalten sind.
Kontrolle 4: Antigen plus Komplement plus Erythrozyten
Die fünfte Kontrolle sollte ausschließen, daß das verwendete Antigen selbst hämagglutinierende Eigenschaften besitzt.

Kontrolle 5: Antigen plus Erythrozyten
Nach Etablierung des Tests lief bei allen Untersuchungen ein Serum mit positivem Titer mit und diente so ebenfalls zur sicheren Bewertung des Hauptversuchs.

3.1.8. Die Komplementbindungsreaktion (KBR)

Hinsichtlich der Technik der KBR sei auf die Arbeit von BECKER (1) verwiesen. Die KBR wurde ebenfalls mit dem Mikrotitersystem nach einer von Sever modifizierten Kolmer-Technik durchgeführt. Als Virusantigen diente dasselbe eingeengte Virusmaterial wie bei der IAR. Die Gebrauchsverdünnung war 1:4. Die Arbeitsdosis des Komplements betrug 1,5 Komplementeinheiten. Verdünnungsmittel aller Reagenten war wiederum der Veronalpuffer nach MAYER, OSLER, BIER und HEIDELBERGER (16). Als Endtiter galt die Verdünnungsstufe, die eine 50 %ige Hämolysehemmung aufwies.

Kontrollen des Serums, des Virus- und Normalantigens, Komplements und Puffers sicherten das Ergebnis ab. Parallel zu den Hauptversuchen liefen immer ein positives und ein negatives Serum mit.

3.1.9. Der Neutralisationstest (NT)

Zu den in Zweierpotenzen mit Hanks-Laktalbumin-Hefeextrakt-Lösung verdünnten Seren wurde das gleiche Volumen einer Virussuspension mit 100 KID_{50}/0,1 ml gegeben. Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37° C wurde das Gemisch ab einer Verdünnungsstufe von 1:4 auf LLC-MK_2-Zellkulturröhrchen pro Verdünnung in 0,2 ml-Mengen verimpft.

Die Ablesung erfolgte nach 5 - 6 Tagen. Die Titer wurden nach der Methode von KÄRBER berechnet.

3.1.10. Die Auftrennung der Seren

3.1.10.1. Die Gelfiltration

Die Auftrennung der Seren wurde mit Hilfe der Molekularsiebchromatographie (Sephadex G-200) vorgenommen. Um eine befriedigende Durchflußgeschwindigkeit zu erzielen, war es notwendig, das Trockengel drei Tage lang in Veronalpuffer quellen zu lassen. Nachdem Gel und Puffer entlüftet waren, wurde die K5/100 Säule (Pharmacia, Uppsala) gefüllt. Die Gel-Sedimentationszeit betrug 48 Stunden. Das Gel wurde dann für 24 - 36 Stunden mit Veronalpuffer nachgewaschen und anschließend 20 ml Serum auf die Säule gegeben. Der Veronalpuffer wurde mit einer Vielfachschlauchpumpe aus dem Vorratsgefäß entnommen und durchströmte die Säule von unten nach oben. Die Pumpe war auf etwa 30 ml/h Durchflußvolumen eingestellt. Das Eluat wurde mit einem Durchflußphotometer Uvicord II (LKB) überwacht und in einen Fraktionssammler Ultrorac (LKB) geleitet. Ein Schreiber registrierte die Lichtabsorption bei 280 nm.

3.1.10.2. Adsorption von Pferdeserum mit Staph. aureus

Nach einer Methode von KRONVALL, GREY und WILLIAMS (14) erfolgte die Behandlung von Pferdeserum mit Staph. aureus, Stamm Cowan 1.

Der Bakterienstamm Cowan 1 wurde aus einer Bouillon auf Platten verimpft, die als Nährboden Blutagargrundsubstanz II von Oxoid enthielten. Der p_H-Wert des Nährbodens war auf 7,4 eingestellt. Nach 24stündiger Bebrütung wurden die Staphylokokken mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, zentrifugiert (20 min 4.000 U/min) und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Bakterien wurden resuspendiert und 2 Stunden im Wasserbad gekocht. Nach der Zentrifugation (20 min 4.000 U/min) wurde das Sediment mit dem gleichen Volumen Serum suspendiert

und das Gemisch für 10 min bei +20° C belassen. Eine Zentrifugation (10 min 10.000 U/min) schloß sich an. Der Überstand wurde in der gleichen Weise ein zweites Mal mit frischen Staphylokokken adsorbiert, zentrifugiert und der zweite Überstand in der IAR, KBR und der Immunelektrophorese geprüft.

3.1.10.3. Fällung der Immunglobuline mit Ammoniumsulfat

Die Fällung der Immunglobuline erfolgte mit einer bei Zimmertemperatur gesättigten Ammoniumsulfatlösung, die zu einem gleichen Teil Serum langsam unter ständigem Rühren zugegeben wurde. Nach einer stationären Phase bei +4° C über 12 Stunden wurde das Fällungsprodukt abzentrifugiert (20 min 4.000 U/min), in Veronalpuffer aufgenommen und in einem Dialyseschlauch gegen Veronalpuffer dialysiert.

3.1.10.4. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde in der von SCHEIDEGGER (25) beschriebenen Mikro-Modifikation (37) durchgeführt, wobei die Immunelektrophorese-Apparatur von GELMAN (früher LKB) Verwendung fand. Als Trägermedium diente 2 %ige Agarose in Na-Veronalpuffer (p_H 8,2). Die Laufzeit betrug 90 min bei 250 V, die Diffusionszeit des Antiserums 24 Stunden. Anschließend wurde das Resteiweiß herausgewaschen, und die Objektträger wurden gewässert, getrocknet und mit Amidoschwarz 10 B Merck, Darmstadt, gefärbt.

Antiserumgewinnung

Polyvalentes Anti-Pferdeserum wurde im Kaninchen nach folgendem Schema gewonnen:

Erstimmunisierung:

Intrakutane Applikation eines Homogenats aus 2 ml auf 2 % Protein eingestelltem Pferde-Vollserum und 2 ml

komplettem Freundschem Adjuvans (Kombinationspräparat der Fa. Difco) an 15 - 20 Stellen paramedian am Rücken.
Boosterung:
Intramuskuläre Injektion von je 2 ml auf 2 % eingestelltem Pferde-Vollserum dreimal in 14tägigem Abstand auf die 4 Extremitäten verteilt.

Kleinere Blutmengen wurden aus der Ohrrandvene abgenommen, völliges Entbluten fand nach einer Nembutalnarkose durch Herzpunktion statt.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Die IAR als serologische Reaktion

In Vorversuchen mit Pferdeseren, die bereits im NT und in der KBR auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das equine Rhinovirus untersucht waren, ist die IAR, wie bei Material und Methoden geschildert, durchgeführt worden. Nachstehend wird in Tabelle 3 das Ergebnis der Untersuchung von 6 Serumproben, das beispielhaft für eine Untersuchung weiterer Serumproben war, wiedergegeben.

Serum	IAR	KBR	NT	Unspezifität (IAR)
1	1:4	1:32	1:2.898	<1:2
2	1:64	1:64	1:16.000	<1:2
3	<1:2	<1:2	<1:4	<1:2
4	1:64	1:8	1:2.048	1:8
5	1:32	1:16	1:11.500	1:32
6	1:32	1:32	1:16.000	1:16

Tab. 3: Antikörper-Nachweis gegen das equine Rhinovirus 1 mittels IAR, KBR und NT in 6 Pferdeseren

Mit der IAR waren Serumtiter gegen das Rhinovirus equi 1 nachweisbar. Seren mit einem positiven KBR- und NT-Titer

wiesen auch stets einen positiven IAR-Titer auf (Serum 1, 2, 4-6), jedoch waren die NT-Titer den Titern der KBR und der IAR um ein Vielfaches überlegen. Ein Vergleich von IAR und KBR ergab keine völlige Parallelität der Ergebnisse. So konnten bei den Seren 4 und 5 in der IAR höhere Titer festgestellt werden als in der KBR, wohingegen sich bei dem Serum 1 die KBR als empfindlichere Methode erwies. Die Untersuchung des Serums 6 ergab in der KBR wie in der IAR gleichhohe Titer. War ein Serum in der KBR und im NT negativ, ließ sich auch mittels der IAR kein Titer feststellen (Serum 3). Bei den Seren 4-6, die in der KBR und im NT positiv bewertet wurden und die auch IAR-Titer aufwiesen, traten in den IAR-Serumkontrollen (mit Komplement) unspezifische Reaktionen auf. Diese unspezifischen Titer waren bei Serum 4 und 6 niedriger als die eigentlichen IAR-Titer im Hauptversuch. Bei Serum 5 erreichte der unspezifische IAR-Titer die gleiche Höhe. Damit war eine eindeutige Bewertung des Hauptversuchs bei Serumprobe 5 nicht möglich.

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, daß die IAR als serologische Reaktion zum Nachweis von Rhinovirus equi 1 Antikörpern in Pferdeseren geeignet ist. Weitere Untersuchungen sollten:

1. klären, wie sich die IAR-Titer und die unspezifischen Titer verteilen und zueinander verhalten,
2. die IAR mit der KBR und dem NT vergleichen.

So wurden 323 Serumproben in der IAR und KBR, 62 Proben im NT getestet.

Die prozentuale Verteilung der IAR-Titer ist ohne Berücksichtigung der unspezifischen Reaktionen in Tabelle 4 dargestellt.

IAR	<1:2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Anzahl d.Seren	10	8	35	91	79	57	25	11	7
Anteil in %	3,1	2,5	10,9	28,4	24,7	17,8	7,8	3,4	2,1

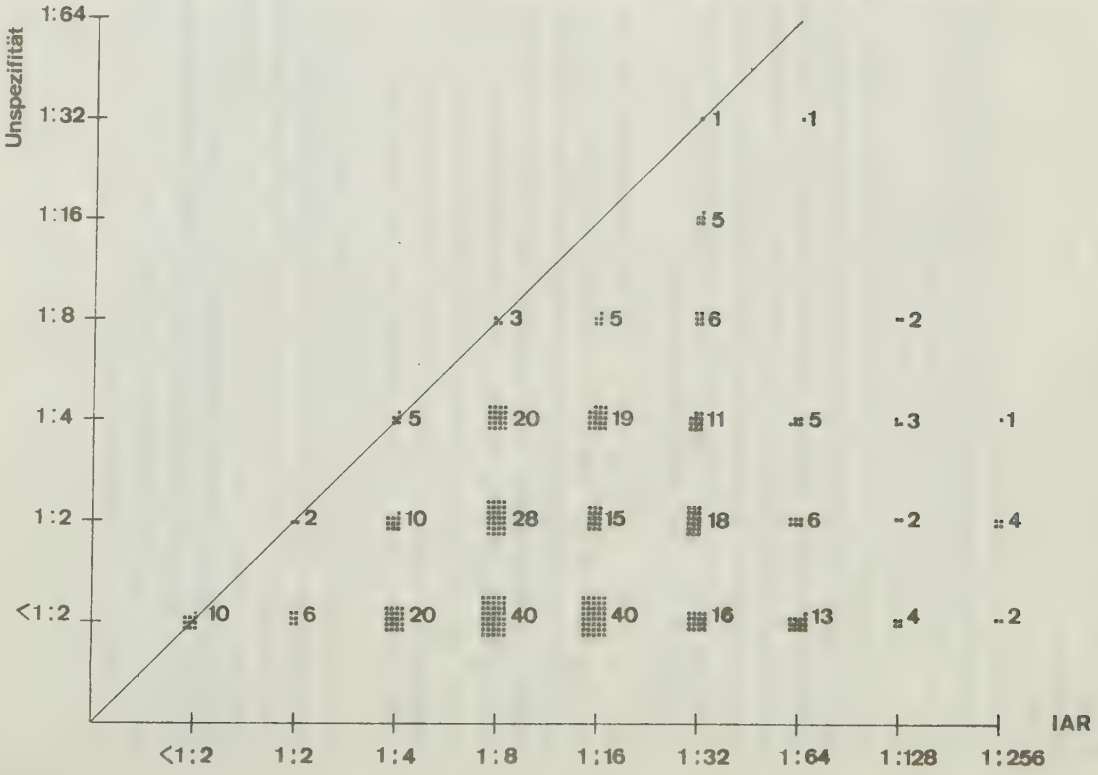
Tab. 4: Verteilung der ermittelten IAR-Titer in Pferdeseren gegen das equine Rhinovirus 1 (Stamm NM_{11}), ohne Be-Berücksichtigung der unspezifischen Reaktionen

Bei 10 Seren konnten mit der IAR keine Antikörper gegen das equine Rhinovirus nachgewiesen werden. Ihnen standen 313 Pferde (96,9 %) mit Titern zwischen 1:2 und 1:256 gegenüber. Die überwiegende Mehrzahl der Pferde (89,6 %) enthielt im Serum Antikörper in Titerstufen zwischen 1:4 und 1:64. Bei 11 Serumproben konnten mit der IAR Titer von 1:128 und in 7 Proben von 1:256 nachgewiesen werden.

Bei 172 Proben (52,9 %) kam es in den Serumkontrollen in Anwesenheit von Komplement zu unspezifischen Reaktionen, während die Serumkontrollen ohne Komplement sowie die Antigen-, Normalantigen- und Komplementkontrollen eindeutig negativ waren. Die Verteilung der Unspezifität (Tab. 5) zeigt, daß 26,5 % der Proben in der Verdünnung 1:2, 19,9 % 1:4, 4,9 % 1:8, 1,4 % 1:16 und 0,6 % einen Titer von 1:32 aufwiesen.

Zur besseren Charakterisierung des Verhaltens von Spezifität zu Unspezifität sind in der Abb. 1 die Unspezifitätstiter gegen die IAR-Titer aufgetragen. Aus dieser Darstellung geht hervor, daß 10 Seren in der IAR und in den Serumkontrollen negativ (<1:2) ausfielen. Bei 11 Seren (3,4 %) waren die Unspezifitätstiter mit den IAR-Titern identisch. Bei 302 Seren (93,4 %) konnte der IAR-Titer klar vom unspezifischen Titer abgegrenzt werden.

Abbildung 1 Graphischer Vergleich von IAR und unspezifischer Reaktion in der IAR miteinander



	< 1:2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Anzahl d.Seren	151	85	64	16	5	2
Anteil in %	47,1	26,5	19,9	4,9	1,4	0,6

Tab. 5: Verteilung der Unspezifitätstiter der Serumkontrollen mit Komplement in der IAR

Die Abschätzung der Schwankungsbreite der unspezifischen Reaktion kann nach der Annahme, daß es sich bei den 323 Seren um repräsentative Stichproben handelt, vorgenommen werden. Unter Ausklammerung der 10 eindeutig negativen Seren kann für die Seren mit positiven Titern, bei denen der Anteil von spezifischem Titer und unspezifischem Titer nicht zu trennen war, mit einem Vertrauensbereich von 95 % folgende Bereichsschätzung gemacht werden (7):

$$p\ (1{,}8 \leq p \leq 6{,}3) = 0{,}95$$

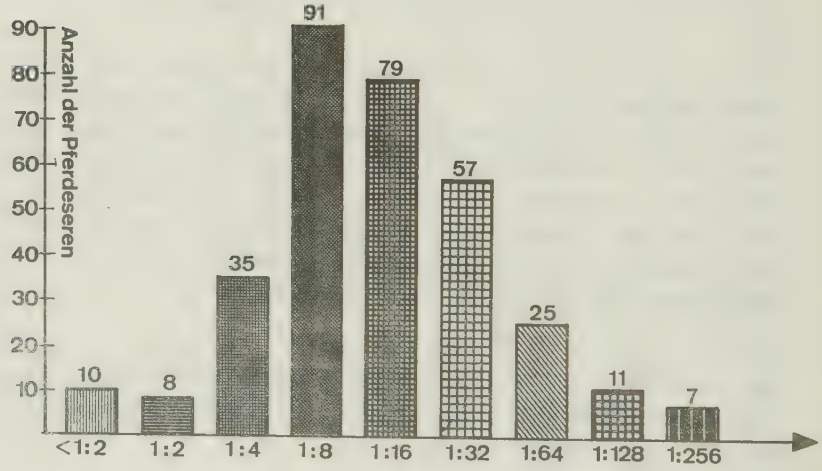
Das heißt, bei einer 5 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit kann die Unspezifität den Hauptversuch zu 1,8 - 6,3 % so belasten, daß er nicht mehr zu bewerten ist.

In den graphischen Darstellungen 2 und 3 werden die Titer der IAR denen der KBR gegenübergestellt. Während in 18 Serumproben keine komplementbindenden Antikörper gegen das equine Rhinovirus nachzuweisen waren, betrug die Zahl der negativen Seren in der IAR nur 10. In den Titerhöhen 1:2 bzw. 1:4 standen 72 Serumproben in der KBR 43 Proben in der IAR gegenüber. Auf den Titer 1:8 fielen die meisten Serumproben, und zwar bei der KBR 96 und bei der IAR 91 Proben. Mit einem Titer von 1:16 wurden 79 Seren in der IAR, 74 Seren in der KBR bewertet. Einen Titer über 1:16 hatten in der IAR 100 und in der KBR nur 63 Seren. Während 7 Seren in der IAR einen Titer von 1:256 erreichten, lagen die höchsten Titer in der KBR bei 1:128 (3 Seren).

Zur besseren Gegenüberstellung von KBR und IAR sind in

Abbildung 2

Gegenüberstellung der Verteilung von IAR- bzw. KBR-Titer von 323 Pferdeseren



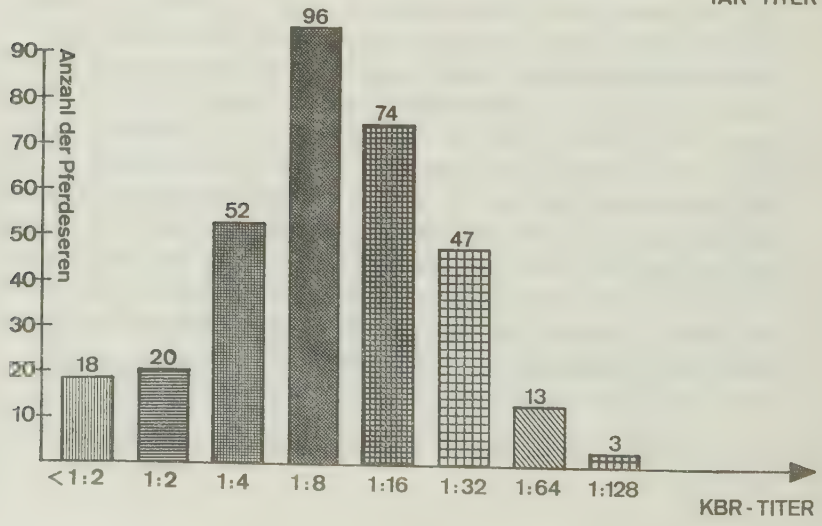


Abbildung 3 Der Antikörpertiter von 323 Pferdeseren gegen das equine Rhinovirus 1, gemessen mittels der KBR+IAR, zum Vergleich beider Nachweismethoden gegeneinander aufgetragen

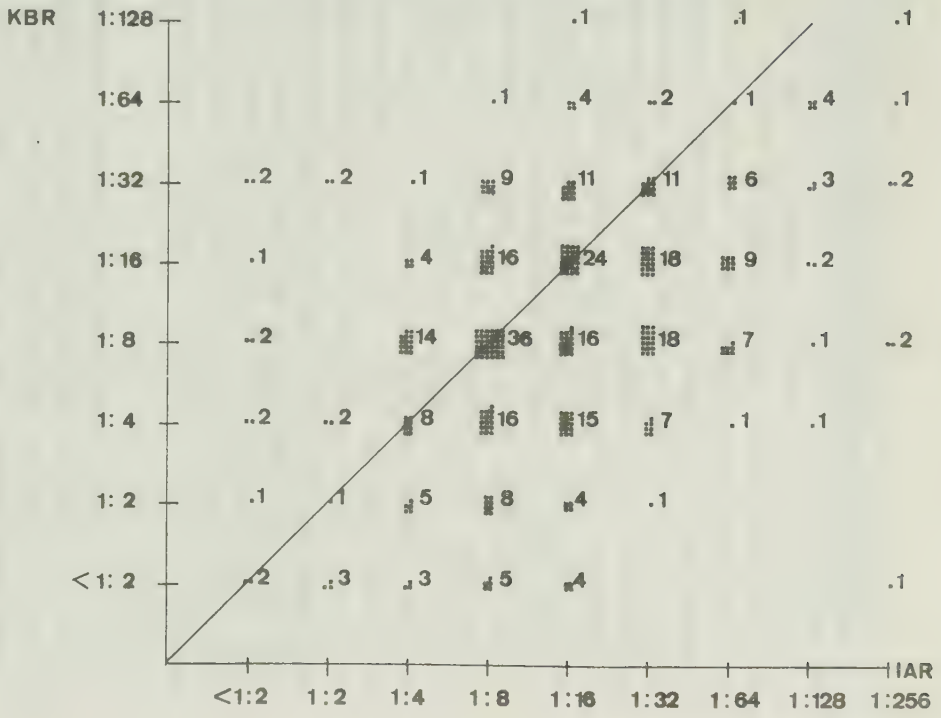


Abb. 3 die entsprechenden Serumwerte gegeneinander aufgetragen. Wird die graphische Darstellung visuell beurteilt, kann vermutet werden, daß zwischen den aufgetragenen IAR- und KBR-Titern keine Symmetrie vorhanden ist. Die Symmetrie wäre aber bei Gleichheit der serologischen Methoden zu erwarten. Um diese Aussage abzusichern, wurde der Vergleich korrelierender Verteilungen von Alternativdaten herangezogen (15). Korrelierende Stichproben liegen vor, wenn ein und dieselbe Stichprobe zweimal, z.B. mit einer anderen ebenfalls nur mit diskreten Stufenaussagen arbeitenden Methode untersucht wird. Diese Voraussetzung trifft hier zu, da jedes der untersuchten Seren mit dem IAR- und KBR-Titer zwei Beobachtungsdaten liefert, die paarweise einander zuzuordnen sind. Eine statistische Prüfung mit Hilfe des SNEDICOR-Tests zeigt erst eine Signifikanz bei beachtlichen Unterschieden an, weil die paarweise vorliegende Information preisgegeben wird. Deshalb soll nicht der Q-Test von COCHRAN, sondern der Symmetrie-Test von BOWKER Anwendung finden. Der Test prüft die Hypothese, daß eine hohe Korrelation der Methoden eine vollständige Symmetrie bedingt. Bei vorgegebener Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % führt der BOWKER-Test jedoch zur Ablehnung der Hypothese. Dies könnte bedeuten, daß IAR und KBR z.B. andere Qualitäten erfassen.

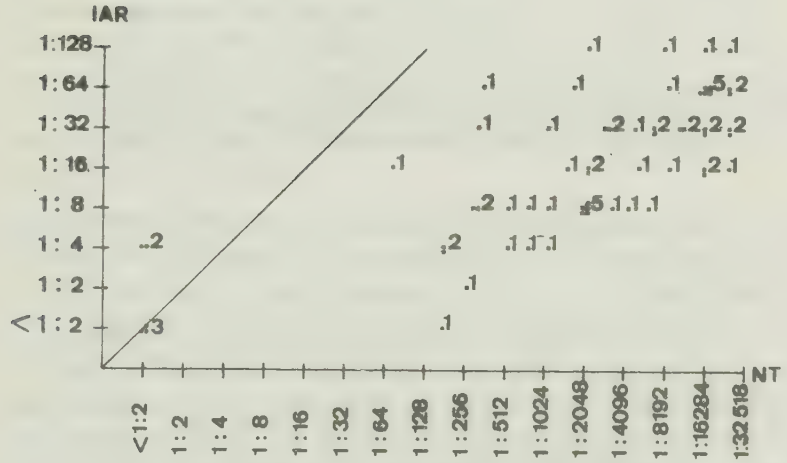
In der Abb. 4 werden IAR und NT bzw. KBR und NT gegenübergestellt. Aus der Darstellung geht eindeutig die Überlegenheit des NT gegenüber der IAR und der KBR hervor. Nur in 2 Serumproben reagierte die IAR empfindlicher als der NT, die KBR in einer Probe.

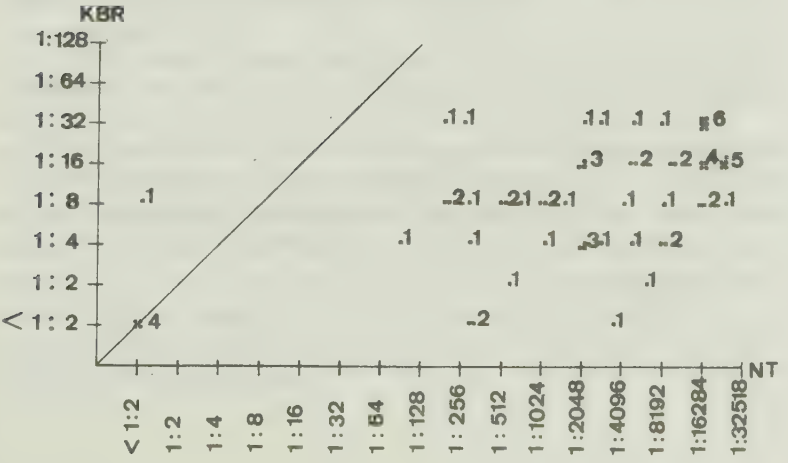
3.2.2. Weitere Absicherung der Spezifität

Zur weiteren Absicherung der Spezifität der IAR wurden 27 Serumpaare mittels KBR, IAR und NT untersucht. In Tabelle 6 sind die Testergebnisse von 3 der 27 Serumpaare aufgezeichnet.

Abbildung 4

Graphischer Methodenvergleich von IAR- und KBR- gegenüber den Neutralisationstitern von 62 Pferdeseren gegen das equine Rhinovirus 1





Serum-Nr.	KBR	IAR	Unspez.IAR	NT
1 a	<1:2	<1:2	<1:2	<1:4
b	1:8	1:8	1:2	1:1.024
2 a	1:4	1:64	<1:2	1:8.185
b	1:16	1:128	1:8	1:23.174
3 a	1:4	1:16	<1:2	1:2.048
b	1:32	1:64	<1:2	1:16.000

Tab. 6: Vergleichende Untersuchung von 3 Pferdeserumpaaren mittels IAR, KBR und NT. Der zeitliche Abstand bei der Entnahme der 2 Proben beträgt 4 Wochen

Die Werte zeigen, daß sich mittels der IAR ein Titeranstieg nachweisen ließ, der mit einem Anstieg in der KBR und im NT einherging.

Wie bereits in Tabelle 1 dargestellt, muß die IAR von der komplementabhängigen mixed aggregation abgegrenzt werden. Um eine komplementabhängige mixed aggregation auszuschließen, wurde Meerschweinchen-Komplement mit Indikator-Erythrozyten absorbiert. Verschiedene Serumproben von Pferden wurden in der IAR geprüft, wobei das absorbierte Komplement Verwendung fand. Als Kontrollen liefen im Hauptversuch dieselben Seren unter Verwendung von unbehandeltem Meerschweinchen-Komplement mit. Da zwischen Test- und Kontrollseren keine Titerunterschiede festzustellen waren, konnte eine komplementabhängige mixed aggregation ausgeschlossen werden.

Eine Chloroform-Behandlung verschiedener Pferdeseren wurde durchgeführt, da Seren mit erhöhtem Lipidgehalt das Zusammenrutschen des Hämagglutinationsschleiers fördern sollen. Titerunterschiede im Vergleich zu unbehandelten Seren waren nicht festzustellen.

3.2.3. Versuche zur Beseitigung der Unspezifität

Die Aufgabe weiterer Untersuchungen war es, die in den Serumkontrollen mit Komplement auftretende Unspezifität zu beseitigen.

Zunächst sollte die Abhängigkeit der unspezifischen Reaktion von Komplementchargen geprüft werden. Hierzu wurden 10 Pferdeseren in der IAR getestet und das jeweilige Komplement von 5 Meerschweinchen verwendet. Die 5 Meerschweinchen stammten aus zwei verschiedenen Beständen, waren unterschiedlich gehalten und unterschiedlich alt. Trotz Verwendung verschiedener Komplementchargen blieb die unspezifische Reaktion erhalten.

Eine Absorption von 10 Pferdeseren mit Indikator-Erythrozyten wurde durchgeführt und anschließend in der IAR gegenüber unbehandelten Seren ausgetestet. Die absorbierten Seren zeigten bis auf den methodisch bedingten Verdünnungseffekt keine Verminderung der Unspezifität.

Zur Beseitigung möglicher Inhibitoren, welche die Unspezifität bedingen könnten, wurde eine Reihe von Seren mit Kaliumperjodat, Kaliumdioxyd und Kaolin behandelt. Mit keiner dieser Behandlungen gelang es jedoch, die unspezifische Reaktion zu beseitigen. Lediglich durch den methodisch bedingten Verdünnungseffekt kam eine Verminderung der Unspezifität zustande.

Durch Fällung mit Ammoniumsulfat sollte untersucht werden, ob die unspezifische Komponente des Serums fällbar ist. Nach Fällung bei 50 %iger Sättigung ist das Sediment gewaschen, resuspendiert und ebenso wie der Überstand gegen Veronalpuffer dialysiert worden. Zusammen mit den unbehandelten Seren erfolgte dann die Testung in der IAR. Dabei zeigte sich, daß gegenüber den Vollseren die unspezifische ebenso wie die spezifische Komponente durch das Ammoniumsulfat gefällt worden war, während der Überstand in der IAR keinerlei Reaktion ergab.

Ein weiterer Versuch, die Unspezifität zu beseitigen, ergab sich aus den Fraktionierungsversuchen von 2 Pferdeseren mit dem Staphylococcus aureus Stamm Cowan 1. Die adsorbierten Seren wurden in der IAR getestet. Dabei ergab sich keine Reduktion der Unspezifität, wohl aber des spezifischen Titers.

Anders verhielt sich jedoch die unspezifische Komponente von 10 Pferdeseren nach Behandlung mit 2-Mercaptoäthanol (27). Gegenüber unbehandelten Seren trat in keiner Serumkontrolle eine unspezifische Reaktion auf. Im Hauptversuch waren hingegen außer den methodisch bedingten Verdünnungseffekten keine Titerverluste zu verzeichnen. In der KBR konnten bei den behandelten Seren keine komplementbindenden Antikörper mehr festgestellt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die unspezifische Komponente des Serums durch Ammoniumsulfat fällbar und mercaptoäthanolsensitiv ist. Die Behandlung der Seren mit Kaliumperjodat, Kohlendioxyd, Kaolin, die Absorption der Seren mit Staph. aureus und die Absorption des Komplements und der Pferdeseren mit Indikator-Erythrozyten beeinflussen die Unspezifität nicht.

3.2.4. Die Auftrennung der Seren

3.2.4.1. Die Gelfiltration

Die serologischen Untersuchungsbefunde zeigten, daß mittels der IAR virusspezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Fraktionierung und andere Behandlungen von Einzelseren, verbunden mit serologischer Auswertung, sollten darüber Aufschluß geben, wie die IAR immunologisch einzuordnen ist.

Die Auftrennung der Seren (34) erfolgte mit der Molekularsiebchromatographie (Sephadex G-200). Es wurden 22 Läufe durchgeführt, pro Lauf wurden 20 ml auf die Säule gegeben. Die registrierten Elutionsdiagramme wiesen je 3 Gipfel (Peaks) und 2 Täler auf. Der 1. Peak war in seiner Höhe

immer dem 2. und 3. Peak unterlegen. Der 3. Peak lief auf die Nullinie aus.

Die einzelnen Fraktionen (15 ml) jedes Laufes wurden in den IAR- und KBR-Fraktionen in Abständen auch im NT geprüft. Dabei ergab sich folgende Verteilung:

1. Fraktionen des 1. Peak waren in der KBR positiv, in der IAR und im NT negativ und zeigten in der IAR eine unspezifische Reaktion.
2. Fraktionen des 2. Peak waren in der IAR und im NT positiv, des ansteigenden Schenkels auch in der KBR.
3. Fraktionen des 3. Peak waren in der IAR, KBR und im NT negativ.

Das Elutionsdiagramm zeigt die graphische Darstellung 5. Da nur der 1. und der 2. Peak Titer aufwiesen, ist der 3. Peak nicht dargestellt. Neben den komplementbindenden Antikörpern waren in einigen Fraktionen des 1. Peak Unspezifitäten in der IAR nachzuweisen. Fraktionen des 2. Peak waren in der KBR nur im ansteigenden Schenkel positiv. Die höchsten Titer in der IAR und im NT wurden mit den Fraktionen vom Scheitel des 2. Peak erreicht.

Die immunelektrophoretische Beurteilung der Fraktionen aus dem 1. Peak (PI), dem ansteigenden Teil des 2. (PIIa) und dem Rest des 2. Peak (PIIb) ergab folgendes Bild:

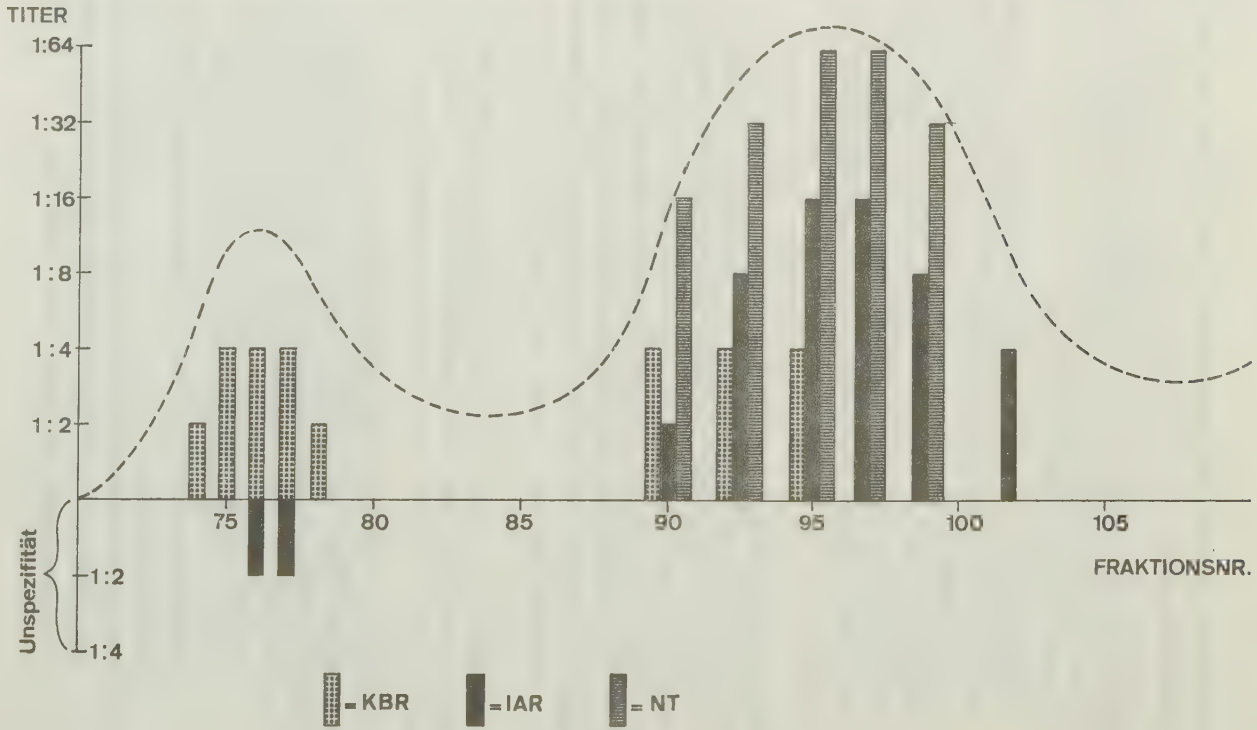
PI: Eine eindeutige Präzipitationsbande, die als IgM angesprochen werden könnte, ist nicht darstellbar.

PIIa: Anlehnend an die Beobachtungen von HELMS und ALLEN (10) werden drei IgG-Subklassen gezeichnet, die offensichtlich gemeinsame antigene Determinanten besitzen. Eindeutig kann jedoch nur die IgG_2-Linie (von anderen Autoren als $IgG_{a,b}$ bezeichnet) identifiziert werden.

PIIb: Die IgG_2-Linie weist im Gegensatz zur Fraktion IIa eine zusätzliche Aufspaltung auf, die auf die Präsenz einer weiteren IgG-Subklasse hindeutet.

Abbildung 5

Elutionsdiagramm eines Pferdeserums (Sephadex G-200) und Testung der Fraktionen in der IAR, KBR und im NT



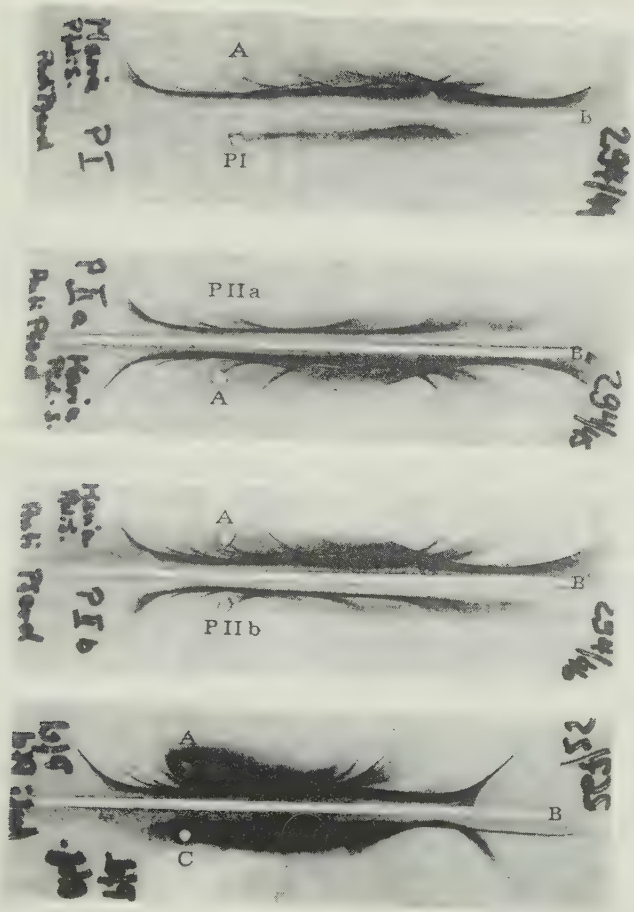


Abb. 6: Immunelektrophoretische Befunde von Pferdeseren vor und nach Auftrennung durch Gelfiltration bzw. vor und nach Adsorption an Staph. aureus, Stamm Cowan 1.
In die Löcher wurden aufgetragen: Pferdevollserum (A), 1. Peak (PI), ansteigender Schenkel des 2. Peak (PIIa), Gipfel und abfallender Schenkel des 2. Peak (PIIb), adsorbiertes Serum (C). Der Graben enthielt stets Kaninchen-Anti-Pferdeserum (B).

3.2.4.2. Serumfraktionierung mit Staph. aureus

Die Adsorption von 2 Pferdeseren erfolgte mit Staph. aureus Stamm Cowan 1. Anschließend wurden die adsorbierten Seren in der IAR, KBR, im NT und immunelektrophoretisch geprüft. Alle drei serologischen Tests ergaben einen negativen Titer (<1:2), wobei in den Serumkontrollen mit Komplement die Unspezifität in der IAR nicht beseitigt werden konnte.

In der Immunelektrophorese (Abb. 6) erweist sich das behandelte Serum als nahezu IgG-frei, eine größere Anzahl von Präzipitationsbanden im ß- und ɣ-Bereich fehlt. Ob auch IgM fehlt, läßt sich mit dem zur Verfügung stehenden Antiserum nicht nachweisen, da dieses Immunglobulin nicht gezeichnet wird.

Ein weiterer Versuch sollte klären, in welchen Fraktionen der Gelfiltration Immunglobuline vorhanden sind, die an Staph. aureus adsorbiert worden sind. So wurde einerseits ein unbehandeltes Pferdeserum mit Hilfe der Gelfiltration aufgetrennt, andererseits ein an Staph. aureus adsorbiertes Serum. Die Elutionsdiagramme sind in der Abb. 7 aufgetragen.

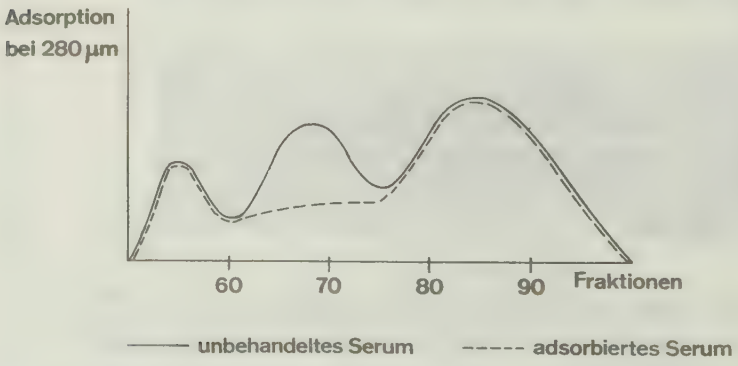


Abb. 7: Elutionsdiagramme eines unbehandelten und eines an Staph. aureus adsorbierten Pferdeserums (eingestellt auf 2 % Eiweißgehalt)

Aus der Abb. 7 geht deutlich hervor, daß die Staphylokokken einen Teil der Immunglobuline adsorbiert haben, die in den Fraktionen des 2. Peak enthalten waren.

3.2.5. Zusammenfassende Darstellung der Fraktionierungsversuche von Pferdeseren

Alle durchgeführten Fraktionierungsversuche von Pferdeseren und deren serologisches Verhalten sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt. Vollseren, die einen positiven KBR-, NT- und IAR-Titer besaßen, wiesen zu 52,9 % in den Serumkontrollen mit Komplement einen unspezifischen Titer in der IAR auf.

Nach Ammoniumsulfatfällung ließ sich mit dem gewaschenen und wieder aufgelösten Sediment eine positive KBR, IAR und NT durchführen, während alle Reaktionen mit dem Überstand negativ verliefen. Ebenso verhielt sich die unspezifische Komponente des Serums.

Die Gelfiltration zeigte, daß die Fraktionen des 1. Peak negative serologische Ergebnisse in der IAR und im NT aufwiesen, wohingegen KBR und unspezifische Reaktion (IAR) positiv ausfielen. Die Fraktionen des 2. Peak waren in der IAR und im NT positiv und zeigten keine Unspezifität. Komplementbindende Antikörper waren nur in den Fraktionen des ansteigenden Schenkels vom 2. Peak nachzuweisen.

Die Behandlung der Pferdeseren mit 2-Mercaptoäthanol beseitigte die Unspezifität in der IAR. Komplementbindende Antikörper konnten nach dieser Behandlung nicht nachgewiesen werden. Die IAR- und NT-Titer blieben hierbei unbeeinflußt.

In den mit Staph. aureus adsorbierten Seren konnten weder in der KBR noch IAR noch im NT Antikörper nachgewiesen werden. Die unspezifische Reaktion in der IAR blieb jedoch erhalten.

	KBR	NT	IAR	Unspez.(IAR)
Vollserum	+	+	+	+
Ammoniumsulf. gef. Serum Überstand	-	-	-	-
Ammoniumsulf. gef. Serum Sediment	+	+	+	+
Gelfiltration 1. Peak	+	-	-	+
Gelfiltration 2. Peak ansteig. Schenk.	+	+	+	-
Gelfiltration 2. Peak	-	+	+	-
2-Mercaptoäth. behand. Serum	-	+	+	-
Staph. aureus behand. Serum	-	-	-	+

Tab. 7: Zusammenfassende Darstellung der Fraktionierungsversuche von Pferdeseren und deren serologisches Verhalten

4. DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, daß mit der IAR ähnlich wie mit der KBR und dem NT virusspezifische Antikörper gegen das Rhinovirus equi 1 in Pferdeseren nachweisbar sind. Dies konnte insbesondere an 27 Serumpaaren festgestellt werden. Die Serumproben waren im Zeitabstand von 4 Wochen entnommen worden und hatten in der KBR und im NT ansteigende Antikörpertiter gezeigt, was annehmen ließ, daß sich die Pferde mit dem Rhinovirus equi 1 auseinandergesetzt hatten. Die Titeranstiege kamen auch bei der IAR zum Ausdruck.

Die Eignung der IAR als serologische Untersuchungsmethode wurde an 323 Pferdeseren geprüft. Dabei ergaben sich in 52,9 % der Seren unspezifische Reaktionen in den Serumkontrollen mit Komplement und somit Schwierigkeiten in der Beurteilung der Ergebnisse. Bei Nichtberücksichtigung dieser unspezifischen Reaktion ließ sich in 96,9 % der untersuchten Seren eine positive Reaktion, d.h. ein Titer zwischen 1:2 und 1:256 nachweisen, während 3,1 % der Proben als eindeutig negativ (<1:2) beurteilt werden konnten. In der KBR hatten demgegenüber 94,4 % (305 Seren) einen positiven Titer und 5,6 % (18 Seren) einen negativen Titer, wenn als positiv ein Titer von ≥1:2 gewertet wurde. Dieser Unterschied von KBR und IAR ist möglicherweise durch die unspezifischen Reaktionen der IAR bedingt. Die unspezifischen Reaktionen traten nur in den Serumkontrollen mit Komplement in Serumverdünnungen von 1:2 bis 1:32 auf, wobei die meisten unspezifischen Reaktionen in einem Bereich von 1:2 und 1:4 festzustellen waren. Eine Gegenüberstellung von spezifischen und unspezifischen Titern zeigt, daß bei 11 Pferdeseren nicht zwischen dem Ergebnis des Hauptversuchs und der Serumkontrolle mit Komplement differenziert werden konnte. Eine Bereichschätzung dieser unspezifischen Reaktionen ergab, daß in 1,8 - 6,3 % aller untersuchten Fälle bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % der Hauptversuch nicht

gewertet werden konnte. In der KBR und im NT kamen hingegen keine unspezifischen Reaktionen bei den untersuchten Serumproben vor.

Versuche zur Beseitigung der Unspezifität in der IAR durch Behandlung der Seren mit Kaliumperjodat, Kohlendioxyd, Kaolin, sowie durch Absorption mit Indikator-Erythrozyten verliefen negativ. Außer einem methodisch bedingten Verdünnungseffekt konnte keine Reduktion der Unspezifität erreicht werden. Anders verhielt sich die unspezifische Komponente nach Behandlung der Pferdeseren mit 2-Mercaptoäthanol. In diesem Fall ließ sich in keiner Serumkontrolle mehr ein unspezifischer Titer nachweisen, während im Hauptversuch der spezifische Titer erhalten blieb. Die 2-Mercaptoäthanol-Empfindlichkeit der unspezifischen Komponente legte die Vermutung nahe, daß dabei Immunglobuline von Bedeutung sein könnten, zumal sich die unspezifische Komponente ähnlich wie die virusspezifischen Antikörper durch 50 %ige Sättigung der Seren mit Ammoniumsulfat beseitigen ließ.

Die von PETERKNECHT und FALKE (21) durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen Herpesvirus simplex in menschlichen Seren mit der IAR erbrachten bezüglich der Höhe der Titer eine Gleichwertigkeit der IAR mit dem NT und eine durchschnittlich zehnfach höhere Empfindlichkeit gegenüber der KBR. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von TEUFEL (30) beim Nachweis von Herpesvirus equi 1 Antikörpern in Pferdeseren erzielt werden.

Wurden IAR, KBR und NT beim Nachweis von Antikörpern gegen das equine Rhinovirus 1 miteinander verglichen, so ergaben sich andere Ergebnisse. Der NT zeigte sich in der Höhe der Titer nicht nur der KBR, sondern auch der IAR um ein Vielfaches überlegen. Im Vergleich von IAR und KBR erwiesen sich beide Reaktionen als verschieden. Dieses Ergebnis wurde durch die vergleichende Auswertung beider Methoden im BOWKER-Test erzielt. Die fehlende Übereinstimmung beider

Methoden durch den statistischen Test könnte darauf zurückzuführen sein, daß in der IAR höhere Titer als in der KBR erzielt werden. In der IAR wiesen 100 Seren einen Titer von 1:32 bis 1:256 auf, während in der KBR nur 62 Seren Titer von 1:32 bis 1:128 zeigten. Es ist nicht anzunehmen, daß die Unspezifität der IAR in diesen Bereichen die Höhe der spezifischen Titer beeinflußt hat, da nur 2 Seren in der Serumverdünnung 1:32 unspezifisch reagierten. Die Unterschiede in der Zahl der positiven Ergebnisse dürften mit einer gesteigerten Empfindlichkeit der IAR zu erklären sein, könnten aber auch darauf beruhen, daß mit der IAR andere Immunglobulin-Klassen als mit der KBR ermittelt werden.

Da die Vermutung bestand, daß die IAR von anderen Immunglobulinen als die KBR getragen wird, wurde versucht, durch Fraktionierung der Seren mittels Gelfiltration oder Behandlung der Seren auf andere Weise über die Art der Immunglobuline Klarheit zu erlangen. Nach Auftrennung einzelner positiver Pferdeseren mit einer Sephadex G-200 Säule ergaben sich 3 Peaks. In den Fraktionen des 1. Peak waren ausschließlich komplementbindende Antikörper vorhanden. Die Fraktionen des 2. Peak verhielten sich in den serologischen Reaktionen IAR, KBR und NT unterschiedlich. Während die IAR und der NT in allen Fraktionen des 2. Peak positiv waren, konnten komplementbindende Antikörper nur in den Fraktionen des ansteigenden Schenkels dieses Peak nachgewiesen werden. Fraktionen des 3. Peak waren in der IAR, KBR und im NT negativ.

Diese Feststellungen sprachen dafür, daß in der IAR und KBR unterschiedliche Immunglobuline von Bedeutung sind. Eine Unterscheidung der IAR-Antikörper von den neutralisierenden Antikörpern war mittels den Gelfiltrationen nicht möglich. In der Immunelektrophorese mit Fraktionen des 2. Peak zeichneten verschiedene IgG-Subklassen, wobei in Anlehnung an HELMS und ALLEN (10) nur das $IgG_{a,b}$ einwandfrei identifiziert werden konnte. Diese $IgG_{a,b}$-Linie wies besonders in den Fraktionen, die in der IAR und im NT positiv waren,

eine zusätzliche Aufspaltung auf, die auf eine weitere IgG-Subklasse hindeutet; d.h. Antikörper, die in der IAR erfaßt werden, brauchen nicht unbedingt mit den neutralisierenden Antikörpern identisch zu sein, sondern könnten einer eigenen IgG-Subklasse zugeordnet werden.

KRONVALL, GREY und WILLIAMS (14) fanden, daß durch Behandlung menschlicher Seren mit Staph. aureus, Stamm Cowan 1, bestimmte IgG-Subklassen isoliert werden können. Diese Adsorption ist nicht an die spezifischen Antigenanheftungsstellen der Immunglobuline gebunden, sondern erfolgt unspezifisch über das Fc-Stück. Nach Behandlung von Pferdeseren mit dem Staphylokokken-Stamm erwiesen sich die Seren als nahezu IgG-frei. Auffallend ist, daß im Gegensatz zu den mit Staph. aureus behandelten Seren von Meerschweinchen und Maus eine wesentlich größere Anzahl von Präzipitationsbanden im ß- und γ-Bereich fehlten (GRUBER, 8). Auch die Gelfiltration (Sephadex G-200) der so behandelten Seren zeigte, daß besonders die Immunglobuline des 2. Peak von den Staphylokokken adsorbiert wurden. Nach Adsorption der Seren mit Staph. aureus ließen sich mittels IAR, KBR und NT keine Antikörpertiter mehr feststellen, was durch das Fehlen der IgG-Klassen zu erklären wäre. Unter Berücksichtigung dessen, daß die KBR im wesentlichen durch das IgM getragen wird, sind die negativen KBR-Titer der adsorbierten Seren nicht zu erklären.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mittels der IAR virusspezifische Antikörper gegen das Rhinovirus equi 1 in Pferdeseren ermittelt werden können. Die Immunglobuline, die in der IAR wirksam sind, gehören der IgG-Klasse an. Eine generelle Anwendung der IAR als serologische Reaktion zum Nachweis von Rhinovirus equi 1 Antikörpern in Pferdeseren kann im Hinblick auf die relativ hohe Zahl der unspezifischen Reaktionen nicht empfohlen werden. Die Unspezifität ist vermutlich immunglobulinassoziiert und läßt sich nur mit 2-Mercaptoäthanol beseitigen. Sie ist ein erheblicher

Nachteil, so daß die IAR, zumal sie keine wesentlich höheren Titer als die KBR ergibt, an Zuverlässigkeit der Ergebnisse der KBR unterlegen ist. Bezüglich der Höhe der Titer ist der NT sowohl der IAR als auch der KBR überlegen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sind 323 Pferdeseren in der Immunadhärenz-Reaktion (IAR) auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das Rhinovirus equi 1 - Stamm NM_{11} - untersucht worden, wobei die Spezifität der Reaktion insbesondere durch den Vergleich von 27 Serumpaaren in der IAR, KBR und im NT aufgezeigt wurde.

96,9 % der Proben hatten Antikörpertiter zwischen 1:2 und 1:256, jedoch zeigten 52,9 % der Seren eine unspezifische Reaktion in den Serumkontrollen mit Komplement, die die eindeutige Bewertung des Hauptversuchs erschwerte. Die Unspezifität ließ sich nur durch die Behandlung der Seren mit 2-Mercaptoäthanol beseitigen. Die 2-Mercaptoäthanol-Empfindlichkeit und die Tatsache, daß sich die unspezifische Komponente wie die virusspezifischen Immunglobuline durch eine 50 %ige Sättigung der Seren mit Ammoniumsulfat fällen ließen, lassen vermuten, daß es sich bei der unspezifischen Komponente um ein Immunglobulin handelt.

Die generelle Anwendung der IAR für die serologische Diagnostik der Rhinovirusinfektion beim Pferd erscheint zweifelhaft, da die IAR keine wesentlich höheren Titer als die KBR erbringt und ihre Bewertung durch die unspezifische Reaktion erschwert ist. Der NT war der IAR und der KBR in der Höhe der erreichten Titer um ein Vielfaches überlegen.

Die Auftrennung von 22 Serumproben durch Gelfiltration (Sephadex G-200) sowie die Adsorption von Pferdeseren an Staph. aureus, Stamm Cowan 1, ergaben, daß die Immunglobuline, die in der IAR wirksam sind, der IgG-Klasse angehören.

6. SUMMARY

THE IMMUNE-ADHERENCE REACTION (IAR) WITH EQUINE RHINOVIRUS STRAIN NM_{11} (SEROTYPE 1) AND ITS SUITABILITY FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF THE DISEASE AND THE TRIAL OF ITS IMMUNOLOGICAL ARRANGEMENT

With the immune-adherence reaction (IAR) 323 serum samples of horses were examined for antibodies against equine rhinovirus 1 (strain NM_{11}). The specifity of the reaction was particularly shown with 27 couples of sera, which were proved in immune-adherence reaction (IAR), complement fixation test (CFT) and neutralization test (NT).

96,9 % of the sera samples had antibody titers ranging from 1:2 to 1:256 but 52,9 % of the horse sera had nonspecific reactions in the serum controls with complement which render more difficult the evaluation of the test. It was only possible to remove the nonspecifity by treating the sera with 2-mercaptoethanol. The 2-mercaptoethanol sensitiveness and the possibility to precipitate the nonspecific component by 50 % saturation of the sera with ammonium sulphate supposed that the nonspecific component is probably associated with an immunoglobulin.

The general use of the IAR for the serological diagnosis of rhinovirus infections seems doubtful because the reaction is not more sensitive than CFT and the evaluation of the test is aggravated by the nonspecific reaction. In comparison with IAR and CFT the superiority of NT was evident.

Fractionating 22 sera samples by gelfiltration (Sephadex G 200) on one hand and by adsorbing the samples to Staph. aureus, strain Cowan 1, on the other hand showed that the immunoglobulins, responsible for the IAR, belong to the IgG class.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. BECKER, W.

Die Komplementbindungsreaktion mit dem equinen Rhinovirusstamm NM_{11} und ihre Eignung zur serologischen Diagnostik der Erkrankung

Vet. med. Diss. Berlin FU (1972)

2. BITTER-SUERMANN, D. u. D. FALKE

Immunadhärenz zum Nachweis virusspezifischer Antikörper und Antigene
II. Immunadhärenz-Hämadsorption zum Nachweis zell- und virusspezifischer Antigene auf Kulturzellen

Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 154, 234 (1968)

3. CLAUSS, I.

Anwendungsmöglichkeiten des Immun-Adhärenz-Phänomens in der Virologie

Med. Diss. Mainz (1970)

4. CLAUSS, I. u. D. FALKE

Immun-Adhärenz zum Nachweis virusspezifischer Antigene und Antikörper
III. Untersuchungen über die Komplement-Aktivierung an Zelloberflächen

Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 156, 272 (1971)

5. CRAWFORD, T.B., T. McGUIRE u. J.B. HENSON

The isolation, characterization and biological functions of major equine immunoglobulin classes

3rd Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Paris 1972

6. FULTON, F.

Immune adherence to tissue culture

Nature (Lond.) 207, 1214 (1965)

7. GEIGY, J.R., AG.

Wissenschaftliche Tabellen. 6. Aufl.

Basel: Geigy 1968. S. 102

8. GRUBER, F.

Persönliche Mitteilung

9. HELMS, C.M. u. P.Z. ALLEN

Studies on equine immunoglobulins
I. The antigenic structure of horse IgG, its fragments and subunits

Immunochemistry 7, 401 (1970)

10. HELMS, C.M. u. P.Z. ALLEN

A comparative immunological examination of some immunoglobulins of several equine species

Comp. Biochem. Physiol. 38B, 439 (1971)

11. KLINMAN, N.R., J.H. ROCKEY, G. FRAUENBERGER u. F. KARUSH

Equine antihapten antibody
III. The comparative properties of IgG and IgA antibodies

J. Immunol. 96, 587 (1960)

12. KLINMAN, N.R., J.H. ROCKEY u. F. KARUSH

Equine antihapten antibody
II. The IgG components and their specific interaction

Immunochemistry 2, 51 (1965)

13. KRONVALL, G. u. R.C. WILLIAMS

Differences in anti-protein-A-activity among IgG subgroups

J. Immunol. 103, 828 (1969)

14. KRONVALL, G., H.M. GREY u. R.C. WILLIAMS

Protein-A-reactivity with mouse immunoglobulins. Structural relationship between some mouse and human immunoglobulins

J. Immunol. 105, 1116 (1970)

15. LIENERT, G.A.

Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik

Meisenheim am Glan: Hain-Verl. 1962. S. 99

16. MAYER, M.M., A.G. OSLER, O.G. BIER u. M. HEIDELBERGER
The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement
J. Exper. Med. 84, 535 (1946)

17. METZGER, H.
Structure and function of gamma M macroglobulins
Adv. Immunol. 12, 57 (1970)

18. MONTGOMERY, P.C.
Molecular aspects of equine antibodies
3rd Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Paris 1972

19. NELSON, D.S.
Immune adherence
Adv. Immunol. 3, 131 (1963)

20. PETERKNECHT, W.
Die Immunadhärenz zum Nachweis virusspezifischer Antigene und Antikörper
Med. Diss. Mainz (1968)

21. PETERKNECHT, W. u. D. FALKE
Immunadhärenz zum Nachweis virusspezifischer Antigene und Antikörper
I. Ausarbeitung der Methode mit Herpesvirus hominis und serologische Spezifität der Reaktion
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 154, 132 (1968)

22. RAYNAUD, M. u. S. ISCAKI
Classification of equine immunoglobulins
Symp. Series immunobiol. Standard 16, 101 (1970)

23. RICE, C.E.
Comparative serology of domestic animals
Adv. Sc. (N.Y.) 2, 105 (1968)

24. ROUSE, B.T. u. D.G. INGRAM
The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk
Immunol. 19, 901 (1970)

25. SCHEIDEGGER, J.J.
Une microméthode de l'immuno-électrophorèse
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

26. SEVER, J.L.
Application of a microtechnique to viral serological investigation
J. Immunol. 88, 320 (1962)

27. SHIMIZU, Y. et al.
Micro indirect hemagglutination test for detecting antibody against infectious bovine rhinotracheitis virus
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 12, 1 (1972)

28. TAVERNE, J.
Immune-adherence of bacteriophage T 2
Brit. J. Exper. Path. 38, 377 (1957)

29. TEUFEL, P. u. W. BECKER
Nachweis komplementbindender Antikörper bei der Rhinovirus-equi-1-Infektion des Pferdes
Zbl. Vet. Med. Reihe B. 19, 840 (1972)

30. TEUFEL, P.
Persönliche Mitteilung

31. TURK, J.L.
Immune-adherence with soluble antigens
Immunol. 1, 305 (1958)

32. TURK, J.L.
The immune-adherence activity of normal serum
Brit. J. Exper. Path. 40, 97 (1959)

33. TURK, J.L.

The relationship between complement and antibodies of different animals in the immune-adherence phenomen

Immunol. 2, 127 (1959)

34. VAERMAN, J.P., P. QUERINJEAN u. J.F. HEREMANS

Studies on the IgA system of the horse

Immunol. 21, 443 (1971)

35. WARRINGTON, R.E. u. D.O. MORGAN

Foot- and-mouth disease virus in cattle and pigs: Use of polyethylene glycol or dextran for purifying 19S IgM immunoglobulin from sera

Arch. ges. Virusforsch. 33, 134 (1971)

36. WOODWORTH, H.C.

Studies with immune-adherence

Immunol. 5, 181 (1962)

37. ZILLMANN, U.

Der Immunglobulin G_{2a}-Spiegel bei Sprague-Dawley-Ratten in Abhängigkeit von Alter und Haltung

Vet. med. Diss. Berlin FU (1971)

Herrn Prof. Dr. Hartwigk danke ich für die Überlassung des Themas meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Teufel für die Einweisung in das Arbeitsgebiet und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie Herrn Dr. Gruber, der mich mit fachlichen Anregungen unterstützte.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

L e b e n s l a u f

17.5.1943	geboren in Berlin
1963	Abitur in Berlin
1967 bis 1972	Studium der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin
1969	Physikum
28.3.1972	3. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
20.4.1972	Bestallung als Tierarzt

B. Ladewig · Dissertationsdruck · 1 Berlin 12 · Pestalozzistraße 106
Tel.: 312 88 85 · 313 81 98